

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/76551 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05272

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 154.7 9. Juni 1999 (09.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH [DE/DE];
Breisacher Strasse 17, D-79106 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRATZ, Felix
[DE/DE]; Klinik für Tumorbiologie, Breisacher Strasse
117, D-79106 Freiburg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AN INJECTABLE MEDICAMENT PREPARATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER INIZIERBAREN ARZNEIMITTELZUBEREITUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing injectable medicament preparations containing a therapeutically and/or diagnostically effective substance which is comprised of an active agent, of a spacer molecule and of at least one substance-binding molecule. After being brought into contact with the body, said therapeutically and/or diagnostically effective substance covalently bonds to the body fluid constituents or tissue constituents via the protein-binding molecule, thus providing a form of transport of the active agent that can be hydrolytically or enzymatically cleaved, according to pH, in the body while releasing the active agent.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile bindet, so dass eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und
10 nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile bindet, so daß eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

15 Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Des weiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen
20 in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential
25 besitzen, wie etwa Zytostatika, Immunsuppressiva oder Virostatika.

Um die Selektivität von niedermolekularen Pharmaka zu verbessern, werden mehrere Strategien verfolgt, beispielsweise die chemische Derivatisierung von Leitstrukturen, die Formulierung als Prodrugs oder die Kopplung der
30 Pharmaka an Trägermoleküle. Die vorliegende Erfindung geht von solchen Konzepten aus, bei denen Pharmaka an körpereigene Makromoleküle chemisch gebunden wurden. Bekannt sind Konjugate, bei denen im

allgemeinen Zytostatika an Serumproteine, vorwiegend an bestimmte Trägermoleküle wie Humanserumalbumin und Humanserumtransferrin, gebunden werden und dann verabreicht werden. Diese bekannten Proteinkonjugate werden dadurch hergestellt, daß man ex vivo entweder in
5 einem "Eintopfverfahren" das Zytostatikum an das Serumprotein koppelt (DE 41 22 210 A1) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat gewinnt oder daß man zunächst das Zytostatikum mit einem geeigneten Spacermolekül derivatisiert, das resultierende Produkt isoliert und in einem
10 zweiten Schritt das so derivatisierte Zytostatikum über eine Maleinimidgruppe an das Protein koppelt (DE 196 36 889 A1 und PCT/DE 97/02000) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat isoliert. Beide Verfahren haben den Nachteil, daß Plasmaproteine verwendet werden, die pathogene Erreger enthalten können. Weitere Nachteile der beschriebenen Protein-Wirkstoff-Konjugate sind ihre unbefriedigende
15 Stabilität und Lagerbeständigkeit und der technische Aufwand ihrer Herstellung.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diese Nachteile zu überwinden. Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung einer
20 injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß als therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff und wenigstens einem proteinbindenden Molekülrest, die
25 durch einen Spacer verbunden sind, verwendet wird, worin der Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar sind. Bei der Spaltung wird der Wirkstoff oder ein Derivat des Wirkstoffes freigesetzt. Unter einem Wirkstoffderivat werden Substanzen verstanden, die den Wirkstoff
30 umfassen, jedoch zusätzlich Teile des Spacers oder der Gruppen, über die der Wirkstoff mit dem proteinbindenden Molekül gebunden war, enthalten können. Die Wirksamkeit des Wirkstoffs sollte durch seine Freisetzung als

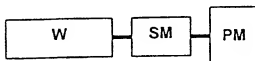
- 3 -

Derivat nicht beeinträchtigt werden. Vorzugsweise entfaltet der Wirkstoff bzw. dessen Derivat seine Wirksamkeit erst nach der Freisetzung.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß es nicht, wie bisher angenommen wurde, nötig ist, einen Wirkstoff mit einem bestimmten Träger unter definierten Bedingungen zu verbinden und das Produkt zu verabreichen, sondern daß es möglich ist, therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen, bestehend aus einem pharmakologischen Wirkstoff, und wenigstens einem proteinbindenden Molekülteil, die durch einen Spacer miteinander verbunden sind, direkt als injizierbare Arzneimittel einzusetzen, da diese nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent derart an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile, vorwiegend an Serumproteine, binden, daß in vivo eine Transportform des Wirkstoffs gebildet wird, welche die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Wirkstoffs erreicht. Da erfindungsgemäß bei der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz die Bindung im Spacermolekül oder zwischen dem Wirkstoff und dem Spacermolekül pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist, wird der Wirkstoff trotzdem gezielt am gewünschten Zielort freigesetzt.

Erfindungsgemäß erhaltene injizierbare Arzneimittelzubereitungen von therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen verändern und verbessern aufgrund ihrer proteinbindenden Eigenschaften das pharmakokinetische Profil der Wirkstoffe entscheidend. Wenn diese therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen in Körperflüssigkeiten gelangen, binden sie kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile, vorzugsweise an Serumproteine, mehr bevorzugt an Serumalbumin, um so als makromolekulare Prodrugs vorzuliegen, die den Wirkstoff zu dem Zielort transportieren und/oder ihn in einer dosierten Form freisetzen.

Die erfindungsgemäß erhaltene therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz besteht aus einem Wirkstoff W, einem Spacermolekül SM und wenigstens einem proteinbindenden Molekül PM mit folgender allgemeiner Struktur:



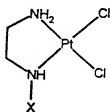
Zusätzlich kann die erfindungsgemäß erhaltene Substanz Markierungsgruppen bzw. markierte Elemente oder Moleküle aufweisen, wobei sich die Substanz dann insbesondere für diagnostische Zwecke eignet. Bevorzugte Marker sind ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, eine oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

Ein Diagnostikum im Sinne dieser Erfindung ist beispielsweise ein wie oben beschrieben markierter Wirkstoff oder ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

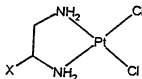
Der Wirkstoff ist ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein Analgetikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Antimykotikum, ein Signaltransduktionsinhibitor, ein Angiogeneseinhibitor oder ein Proteaseinhibitor.

Bevorzugte Zytostatika für die Herstellung von injizierbaren therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine

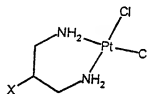
sowie verwandte Derivate, die Antimetabolite Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophyllotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitopodozid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate, die Calicheamicine, die Maytansinoide und eine Verbindung der allgemeinen Formel I bis XII:



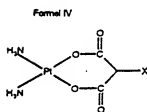
Formel I



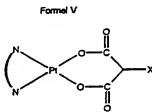
Formel II



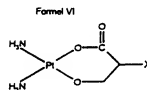
Formel III



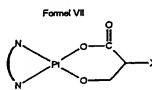
Formel IV



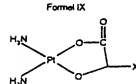
Formel V



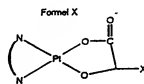
Formel VI



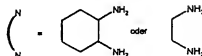
Formel VII



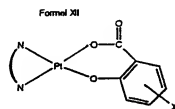
Formel IX



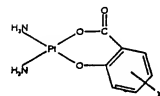
Formel X



Formel XI



Formel XII



Formel XIII

- 6 -

wobei X das Spacermolekül SM oder das proteinbindende Molekül PM bedeutet.

5 Bevorzugte Zytokine für die Herstellung von therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen der vorliegenden Erfindung sind Interleukin 2, Interferon α -2a, Interferon α -2b, Interferon β -1a, Interferon β -1b, Interferon γ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

10 Bevorzugte Immunsuppressiva für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Cyclosporin A und verwandte Derivate, sowie Tacrolimus (FK 506) und verwandte Derivate.

15 Besonders geeignete Antirheumatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Methotrexat und verwandte Derivate.

20 Bevorzugte Analgetika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder Ibuprofen bzw. Naproxen, und Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

25 Bevorzugte Antimykotika für Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Amphotericin B und verwandte Derivate.

30 Bevorzugte Virostatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Nukleosidanaloga, wie etwa Aciclovir, Ganciclovir, Idoxuridin, Ribavirin, Vidaribin, Zidovudin, Didanosin und 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) und verwandte Derivate, und Amantadin.

Bevorzugte Antibiotika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Sulfonamide, wie etwa Sulanilamid, Sulfacarbamid und Sulfametoxydiazin

und verwandte Derivate, Penicilline, wie etwa 6-Aminopenicillansäure, Penicillin G sowie Penicillin V und verwandte Derivate, Isoxazolpenicilline (z.B. Oxacillin, Cloxacillin, Flucloxacillin) und verwandte Derivate, α -substituierte Benzylpenicilline (z.B. Ampicillin, Carbenicillin, Pivampicillin, Amoxicillin) und verwandte Derivate, Acylaminopenicilline (z.B. Mezlocillin, Azlocillin, Piperacillin, Apalocillin) und verwandte Derivate, Amidinopenicilline, wie etwa Mecillinam, atypische β -Lactame, wie etwa Imipenam und Aztreonam, Cephalosporine, wie etwa Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefixim, Cefpodoxim, Cefazolin, Cefazedon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefotiam, Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol, Latamoxef, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefmonoxim, Ceftazidim, Cefsulodin und Cefoperazon und verwandte Derivate, Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Demeclocyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin und verwandte Derivate, Chloramphenicol, wie etwa Chloramphenicol und Thiamphenicol und verwandte Derivate, Gyrasehemmstoffe, wie etwa Nalixidinsäure, Pipemidsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin und verwandte Derivate, und Tuberkulosemittel, wie etwa Isoniazid und verwandte Derivate.

Das Spacermolekül SM ist ein organisches Molekül bestehend aus einer aliphatischen Kohlenstoffkette und/oder einem aliphatischen Kohlenstoffring und/oder mindestens einem Aromaten. Die/der aliphatische Kohlenstoffkette/-ring besteht vorzugsweise aus 1-12 Kohlenstoffatomen, die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, und kann gegebenenfalls substituiert sein, insbesondere durch eine oder mehrere wasserlösliche Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen. Der Aromat ist vorzugsweise ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann, wie etwa mit den obengenannten wasserlöslichen Gruppen. Die aliphatische Kohlenstoffkette kann zur besseren Wasserlöslichkeit Sauerstoffatome enthalten und sich dazu zweckmäßig von einer Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidkette ableiten, z.B. eine Diethylenglycol-, Triethylenglycol- oder Dipropylenglycolkette sein.

Das proteinbindende Molekül PM ist vorzugsweise eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-Hydroxysuccinimidester- oder eine Isothiocyanat-Gruppe. Es kann auch eine Disulfidgruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe oder eine Acetylengruppe sein. Die Disulfidgruppe ist bevorzugt aktiviert, in der Regel dadurch, daß eine Thionitrobenzoesäure (z.B. 5'-Thio-2-Nitrobenzoesäure) die austauschbare Gruppe darstellt. Die Gruppen können gegebenenfalls substituiert sein. Die Maleinimid-, Pyridyldithio- bzw. N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe kann gegebenenfalls mit Alkyl oder mit den obengenannten wasserlöslichen Gruppen substituiert sein. PM besitzt proteinbindende Eigenschaften, d.h. es bindet im physiologischen Milieu kovalent an bestimmte Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Dabei reagiert die Maleinimid-, die Halogenacetamid-, die Halogenacetat-, die Pyridyldithio-Gruppe, die Disulfidgruppe, die Vinylcarbonylgruppe, die Aziridingruppe bzw. die Acetylengruppe vorzugsweise mit HS-Gruppen von Cysteinen, die N-Hydroxysuccinimidester- und Isothiocyanatgruppe reagiert vorzugsweise mit der Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche.

Die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung als injizierbare Arzneimittelzubereitung bereitgestellte therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz gelangt nach parenteraler Applikation in die Blutbahn und kann über PM an Proteine binden. Bevorzugt erfolgt die Bindung an Serumproteine, insbesondere Serumalbumin. Es wurde gefunden, daß im physiologischen Milieu die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz über die Maleinimid-, Halogenacetamid-, Halogenacetat-, Pyridyldithio-Gruppe, die Disulfidgruppe, die Vinylcarbonylgruppe, die Aziridingruppe bzw. die Acetylengruppe insbesondere mit dem freien Cystein-34 des Albumins reagiert und auf diesem Weg kovalent gebunden wird. Pharmakologisch aktive Substanzen mit einer N-Hydroxysuccinimidester- bzw. Isothiocyanat-Gruppe binden bevorzugt an die ϵ -Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche von Albumin oder

anderen Serumproteinen. Serumproteine, wie Albumin oder Transferrin, weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tagen - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. Adv. Protein. Chem. 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für Makromoleküle gelangt Serumalbumin bevorzugt in dieses Zielgewebe (Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an Albumin gekoppelter Wirkstoff gezielter den Wirkort erreichen. Des weiteren verhindert die kovalente Kopplung des Wirkstoffs an Serumproteine in der Blutbahn, daß der Wirkstoff in gesunde Gewebestrukturen des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie der nicht gebundene Wirkstoff. Dadurch wird das pharmakokinetische Profil des Wirkstoffs verändert und verbessert, da seine Wirkung durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen enthalten im Spacermolekül oder zwischen SM und W eine definierte chemische Bindung. Diese Bindung ist pH-abhängig, vorzugsweise säurelabil, spaltbar bzw. hydrolytisch spaltbar, oder sie enthält mindestens eine Bindung, die im Körper enzymatisch gespalten wird, vorzugsweise eine Peptidbindung.

Bindungen, die durch Hydrolyse unter Freisetzung des Wirkstoffs gespalten werden, sind beispielsweise Esterbindungen oder Metallkomplexbindungen, wie sie bei Platin-Dicarboxylat-Komplexen vorliegen, wobei ein Diamminodiaquo-Platin(II)-Komplex freigesetzt wird. Die säurelabilen spaltbaren Bindungen sind Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon-, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindungen oder cis-Aconitylbindungen oder eine Tritylgruppe enthaltende Bindungen, wobei die Tritylgruppe substituiert oder nicht substituiert sein kann. Bevorzugte

therapeutisch/diagnostisch relevante säurelabile Bindungen sind beispielsweise in Kratz et al. (1990) Crit. Rev. Ther. Drug. Car.Sys. 16 (3), 245-288 beschrieben. Die Peptidsequenz in den realisierten Peptidbindungen besteht in der Regel aus etwa 2-30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter Enzyme, nachstehend als Targetenzyme bezeichnet, im Körper zugeschnitten, so daß die Peptidsequenz oder ein Teil diese Sequenz von einem Enzym im Körper erkannt wird und das Peptid gespalten wird. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht die enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Bindung, die keine Peptidbindung ist. Beispiele sind Carbamatbindungen, die durch krankheitsspezifische Enzyme, z.B. Glutathion-S-Transferasen, Glucuronidasen, Galactosidasen, den Wirkstoff oder ein Wirkstoffderivat freisetzen. Es ist auch ohne weiteres möglich, daß eine enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Peptidsequenz und einer der obengenannten Bindungen, die keine Peptidbindung ist, aufgebaut ist. Die Targetenzyme können sowohl körpereigene Enzyme sein oder Enzyme, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden.

Die Targetenzyme sind in der Regel Proteasen, Serinproteasen, Plasminogenaktivatoren und Peptidasen, beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMP) oder Cysteinproteasen, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2, MMP3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B, H und L, die als

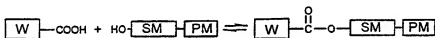
Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind.

Die oben genannten Bindungstypen gewährleisten, daß der Wirkstoff oder ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär nach Aufnahme des Konjugats durch die Zelle freigesetzt wird und seine therapeutische und/oder diagnostische Wirkung entfalten kann.

Die Spaltung kann auch dergestalt ablaufen, dass nicht der Wirkstoff als solcher abgespalten wird, sondern ein Derivat des Wirkstoffs. Ein solches Derivat enthält somit den Wirkstoff sowie daran gebundene Gruppen, die aus dem Spacermolekül stammen, je nachdem, an welcher Stelle die gewünschte Spaltung erfolgt ist.

Die im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz kann gemäß einer der untenstehenden allgemeinen Beschreibungen hergestellt werden:

Wirkstoffe, die eine HOOC-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:

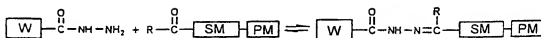


Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu überführen, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE 196 36 889), und das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einem eine Carbonylkomponente enthaltenen Spacer, bestehend aus PM und SM,

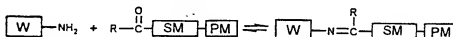
- 12 -

umzusetzen, wie u.a. in DE 196 36 889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben ist:



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

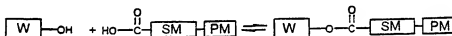
Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine H_2N -Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

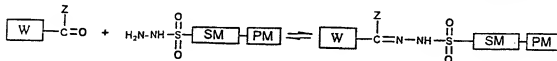
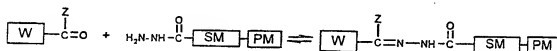
Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

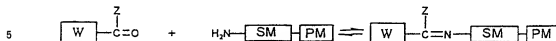
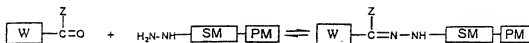
Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine HO-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine Carbonylkomponente besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:

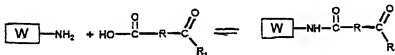
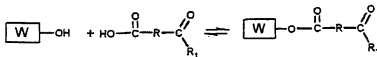




Z = chemische Gruppe des Wirkstoffs

Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36
 10 889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben sind, oder durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Es ist weiterhin möglich, eine HO-Gruppe oder eine NH₂-Gruppe eines Wirkstoffs in eine Carbonylkomponente zu überführen, z.B. durch
 15 Veresterung bzw. Amidbildung mit einer Carbonsäure-trägenden Carbonylkomponente gemäß folgender allgemeiner Formel:



wobei R eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder ein aliphatischer Kohlenstoffring und/oder ein Aromat und R₁ = H, Alkyl-, Phenyl- oder eine
 25 substituierte Phenylgruppe ist. R besteht in der Regel aus 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls substituiert sein können, z.B. durch wasserlösliche Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen. Der Aromat ist in der Regel ein Benzolring, der
 30 gegebenenfalls substituiert sein kann, wie etwa mit den oben genannten wasserlöslichen Gruppen.

Die Carbonylkomponente kann des Weiteren durch andere chemische Reaktionen eingeführt werden, so z.B. durch eine elektrophile Substitution an der HO- oder NH₂-Gruppe des Wirkstoffs mit einer geeigneten Carbonylkomponente.

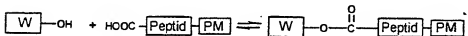
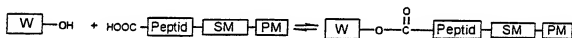
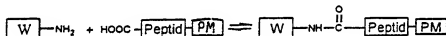
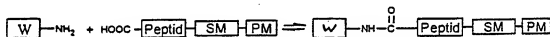
Die so derivatisierten Wirkstoffe, die nun eine Carbonylkomponente besitzen, werden analog zu den oben beschriebenen Verfahren mit den proteinbindenden Spacermolekülen, die eine Amino-, Hydrazid- oder Hydrazingruppe besitzen, zu den entsprechenden Carboxylhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten umgesetzt. Diese säurelabile Spaltung dieser Bindungen führt demnach zu einer Freisetzung des derivatisierten Wirkstoffs, der eine Carbonylkomponente besitzt.

Die Spacer, die aus dem proteinbindenden Molekül PM und dem Spacermolekül SM bestehen, können z.B. gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36 889 A1, U. Beyer et al. *Chemical Monthly*, 128, 91, 1997, R.S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600, 1990, T. Kaneko et al., *Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991, *Bioconjugate Techniques*, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996 oder in US-Patent 4,251,445 beschrieben sind, hergestellt werden.

Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen für die vorliegende Erfindung, die eine Peptidbindung enthalten, können dadurch hergestellt werden, daß ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren besteht, mit einer proteinbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß ein proteinbindendes Molekül direkt oder über ein Spacermolekül SM am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird. Die Synthese von solchen proteinbindenden Peptidderivaten erfolgt vorzugsweise durch eine dem Fachmann geläufige Festphasensynthese, wobei im letzten Schritt des Peptidaufbaus ein Carbonsäure tragendes proteinbindendes Spacermolekül, z.B. eine Maleinimidocarbonsäure, durch Peptidkopplung an das N-terminale ende des Peptids gebunden und das proteinbindende Peptid im Anschluss

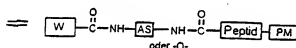
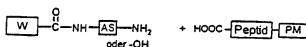
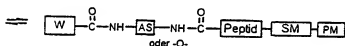
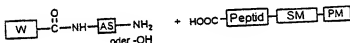
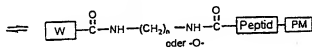
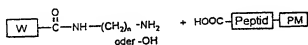
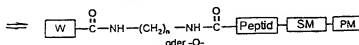
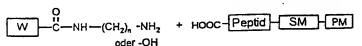
- 15 -

von der Festphase abgespalten wird. Die so erhaltenen Peptidderivate können mit einem Wirkstoff, der eine H₂N- oder HO-Gruppe besitzt, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat (CMC), (Benzotriazol-1-yloxy)-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (pyBOP) oder O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-Hydroxysuccinimids, wie etwa N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz oder 1-Hydroxybenzotriazol und/oder in Gegenwart einer Base, wie z.B. N-Methylmorpholin oder Triethylamin, zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umgesetzt werden:



Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Wirkstoffe eine H₂N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch Derivatisierung mit den Aminosäuren (AS) Lysin, Serin oder Threonin über deren α-Aminogruppe oder über die α-Aminogruppe mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-NH₂ oder mit einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-OH mit n = 1-12, und diese Derivate im Anschluß mit

den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umzusetzen:



AS = Lysin, Serin oder Threonin

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP3, MMP 9, Cathepsin B, H und L, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

Beispielsweise sind Octapeptide ($P_4 - P'_4$) für MMP 2 und MMP 9 identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren, und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden:

- 17 -

Peptid

$$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \quad P'_1 \quad P'_2 \quad P'_3 \quad P'_4$$

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln

(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, 6427-6432).

Die Peptide werden ausschließlich an der $P_1 - P'_1$ -Bindung enzymatisch gespalten.

Desweiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Dipeptide bekannt mit der Sequenz -Arg-Arg-, -Phe-Lys-, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu oder Ala-Leu-Ala-Leu (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulricht, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

oder

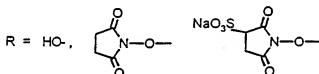
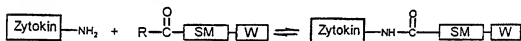
-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen dem proteinbindenden Molekül und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Lys-Phe-Lys-

Entscheidend für die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid vorkommt. Die oben aufgeführten Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die Herstellung von therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen.

Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen für die vorliegende Erfindung, die ein Zytokin enthalten, können dadurch hergestellt werden, daß das Zytokin mit einem eine proteinbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:



Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz) auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins mit einem eine proteinbindenden Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz, zu den entsprechenden proteinbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt zweckmäßig mit Hilfe der Ausschußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind dem Fachmann geläufig (Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Im Anschluß an die Synthese der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz wird eine injizierbare Arzneimittelzubereitung, enthaltend die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, in einer geeigneten Trägerflüssigkeit hergestellt. Die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, wobei vor oder nach dem Lyophilisieren übliche Träger und/oder pharmazeutische Hilfsstoffe, wie etwa Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure beigefügt sein können. Die injizierbare Arzneimittelzubereitung muß so hergestellt werden, daß das proteinbindende Molekül durch das Lösen in der injizierbaren Trägerflüssigkeit nicht deaktiviert, abgespalten oder hydrolysiert wird. Weiterhin muß gewährleistet werden, daß die säurelabile Bindung in der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz, die eine Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindung ist, nicht hydrolysiert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten proteinbindenden Moleküle sind basenempfindlich, so daß der pH-Wert der Trägerflüssigkeit einen pH-Wert von 8,0 nicht überschreiten soll. Bevorzugt liegt der pH-Wert im Bereich von pH 4,0-7,0, mehr bevorzugt zwischen pH 6,0 und pH 7,0. Außerdem muß die Trägerflüssigkeit natürlich physiologisch verträglich sein.

Bevorzugte Trägerflüssigkeiten sind annähernd isotonische Salzpuffer, z.B. Phosphat-, Acetat- oder Citratpuffer, wie etwa, 0.004 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl - pH 6,0-7,0 oder 0.01 M Natriumacetat, 0.14 M NaCl - pH 5,0-6,5). Die verwendete Trägerflüssigkeit kann auch eine isotonische Natriumchloridlösung sein. Die Salzpuffer können übliche Träger und/oder Hilfsstoffe, wie etwa Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure enthalten.

Die Löslichkeit der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz in der injizierbaren Trägerflüssigkeit kann durch pharmazeutische

Lösungsmittel, wie etwa Ethanol, Isopropanol, 1,2-Propylenglykol, Glycerol, Macrogole, Polyethylenglykole bzw. Polyethylenoxide oder durch Lösungsvermittler, z.B. Tween, Cremophor oder Polyvinylpyrrolidon, verbessert werden. Zu diesem Zweck wird die therapeutisch und/oder
5 diagnostisch wirksame Substanz entweder in dem pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler gelöst und anschließend mit einem Salzpuffer verdünnt oder eine Trägerflüssigkeit, enthaltend den Salzpuffer und mindestens ein pharmazeutisches Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler, wird zum Lösen der therapeutisch und/oder diagnostisch
10 wirksamen Substanz direkt verwendet. Die Konzentration der pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler überschreiten dabei nicht die Mengen, die vom Arzneimittelgesetz (AMG) vorgeschrieben sind.

15 Vorzugsweise sollte die Trägerflüssigkeit so ausgewählt werden, daß der Lösevorgang der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz in der Trägerflüssigkeit nach wenigen Minuten abgeschlossen ist, so daß eine injizierbare Arzneimittelzubereitung am Krankenbett zur Verfügung gestellt wird.

20 Es kann auch zusätzlich ein Trägermolekül, wie etwa eines der eingangs genannten, mit der wirksamen Substanz in Kontakt gebracht werden, wobei die wirksame Substanz in der Lage ist, an dieses Trägermolekül zu binden. Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung
25 somit den Schritt des Zusammenbringens des Trägermoleküls und der proteinbindenden therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz ex vivo und anschließender parenteraler Applikation. Auf diesem Weg kann - falls erwünscht bzw. notwendig - die Selektivität der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz für ein Trägermolekül,
30 beispielsweise für Albumin, verbessert werden. Die Trägermoleküle sind bevorzugt ausgewählt aus den genannten, insbesondere Serumproteinen.

Die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, eignet sich somit zur Behandlung von Krebskrankheiten, Viruskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen

5 Erkrankungen und/oder Erkrankungen, die durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen verursacht werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem

10 Wirkstoff, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest aufweist, welcher mit dem Wirkstoff durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Wirkstoff pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Wirkstoffs, wobei der Wirkstoff kein

15 Zytostatikum ist.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Diagnostikum, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens einen

20 proteinbindenden Molekülrest, welcher mit dem Diagnostikum durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Diagnostikum pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Diagnostikums. Wie oben erwähnt, umfaßt das Diagnostikum bevorzugt ein oder mehrere Radionuklide, ein

25 oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

30 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, enthaltend eine erfindungsgemäße proteinbindende diagnostisch wirksame Substanz, gegebenenfalls zusammen mit dem

Trägermolekül und pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffen, Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln, insbesondere ausgewählt aus den oben genannten. Der erfindungsgemäße diagnostische Kit kann bevorzugt zum Nachweis der wie oben definierten Erkrankungen oder zum Nachweis von Trägermolekülen und/oder deren Verteilung im Organismus verwendet werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass als diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung umfassend ein Diagnostikum und wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest verwendet wird. Ein Diagnostikum kann eine der oben genannten Verbindungen sein, beispielsweise ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich. Das Diagnostikum und der wenigstens eine proteinbindende Molekülrest können auch durch einen Spacer verbunden sein. Hierbei ist es bevorzugt, dass der Spacer oder die Bindung, welche die beiden Komponenten verbindet, nicht spaltbar ist. Beispiele für nicht im Körper spaltbare Bindungen, die bei der Bindung zur diagnostisch wirksamen Substanz vorliegen können, sind Amidbindungen, gesättigte bzw. ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder Bindungen zwischen Kohlenstoff und einem Heteroatom, -C-X-, wobei X vorzugsweise O, N, S oder P ist. Eine bevorzugte Bindung ist eine Amidbindung. Die Freisetzung der therapeutisch wirksamen Substanz ist bevorzugt, da in der Regel der niedermolekulare Wirkstoff mit seinem molekularen Target wechselwirken muß, um seine pharmakologische Wirksamkeit zu entfalten. Bei diagnostisch wirksamen Substanzen hingegen ist eine Freisetzung des Protein gebundenen Diagnostikums nicht unbedingt erforderlich, kann aber vorhanden sein. Erfindungsgemäß kann deshalb die

- 23 -

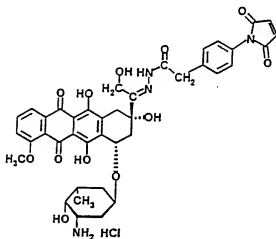
diagnostisch wirksame Substanz zusätzlich über eine nicht im Körper spaltbare Bindung an das Spacermolekül oder direkt an die proteinbindende Gruppe ohne Vorhandensein eines Spacermoleküls SM gebunden sein.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1

Herstellung von DOXO-HYD

Die im folgenden abgebildete pharmakologisch aktive Substanz (abgekürzt DOXO-HYD) besteht aus dem Zytostatikum Doxorubicin, aus einer Maleinimidgruppe als proteinbindendes Molekül PM und aus einem Phenylacetylhydrazonspacer als Spacermolekül SM. Die Bindung zwischen Doxorubicin und dem Spacermolekül SM ist eine säurelabile Carboxylhydrazonbindung:

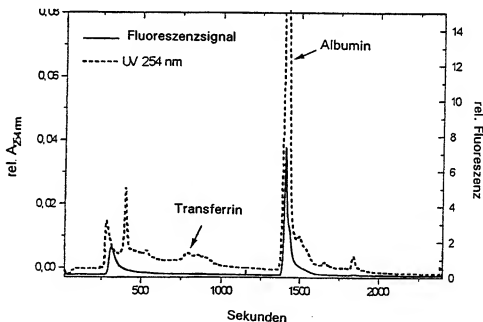


10,51 mg DOXO-HYD werden in 2,0 ml 1,2-Propylenglykol durch Schütteln gelöst und anschließend wird diese Lösung mit 8,0 ml Phosphatpuffer (0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 6,5) verdünnt und homogenisiert (Konzentration von DOXO-HYD in der Trägerflüssigkeit \approx 1300 μ M). Die so hergestellte injizierbare Arzneimittelzubereitung von DOXO-HYD wurde Versuchstieren unmittelbar intravenös verabreicht (siehe unten).

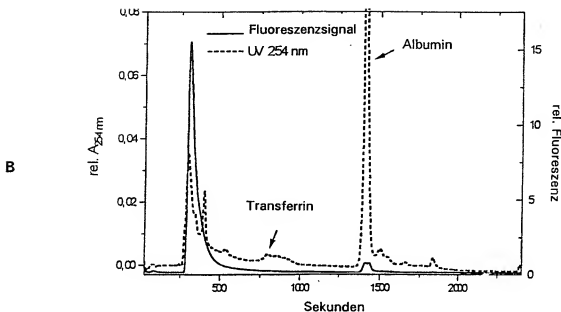
Beispiel 2**Bindung von DOXO-HYD an Humanplasma**

Nachdem DOXO-HYD in die Blutbahn gelangt, findet eine Bindung an Serumproteine statt, vorzugsweise an Serumalbumin, so daß DOXO-HYD u.a. als säurelabiles Albumin-Doxorubicin-Konjugat vorliegt.

Inkubationsstudien von Humanblutplasma mit DOXO-HYD bei 37 °C zeigen, daß nach einer 5-minütigen Inkubation der Großteil von DOX-HYD kovalent an Albumin gebunden ist. (A) - im Gegensatz zu freiem Doxorubicin (B). Dieser Sachverhalt ist in den untenstehenden Chromatogrammen dargestellt. (A und B):

A

- 25 -



Hierbei wurde nach erfolgter Inkubation die Plasmaprobe über eine POROS®-20-Anionenaustauschersäule getrennt (Detektion der Proteine bei 254 nm, Detektion des Anthrazyklins durch Fluoreszenz).

Beispiel 3

Die Wirksamkeit von DOXO-HYD in vivo

Die unten aufgeführten biologischen Daten verdeutlichen die in vivo Wirksamkeit von DOXO-HYD im Vergleich zu freiem Doxorubicin: Im sogenannten RENCA (renal cell carcinoma)-Modell wurde Doxorubicin und DOXO-HYD hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei annähernd äquitoxischer Dosis miteinander verglichen (intravenöse Therapie 10 Tage nach Injektion von etwa 1 Million Nierenkarzinomzellen in der linken Niere).

Tiere: Balb/c-Mäuse, weiblich; **Tumor:** RENCA, renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)

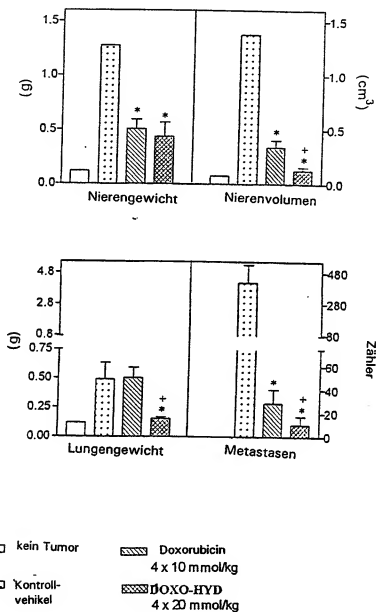
Therapie: Tag(d) 10, 13, 17 und 20 intravenöse (i.v.), Ende des Versuchs d24

| Anzahl der Mäuse | Substanz | Dosis | Durchschnittliche Körpergewichtsabnahme (%) d 1-24 |
|------------------|-------------|----------------|--|
| | | | |
| 10 | Kontrolle | | |
| 10 | Doxorubicin | 4 x 10 mmol/kg | -15 |
| 10 | DOXO-HYD | 4 x 20 mmol/kg | -15 |
| | | | |

Die Ergebnisse dieses Versuches sind untenstehend abgebildet. DOXO-HYD zeigt eine sehr gute antitumorale Wirksamkeit und erzielt eine deutliche Reduktion des Nierentumorvolumens und der Anzahl von Lungenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Doxorubicin behandelten Gruppe.

- 27 -

Gewicht und Volumen der Nieren und Nierentumoren sowie Anzahl der Lungenmetastasen



* signifikant zur Kontrollgruppe (Kontrolle)

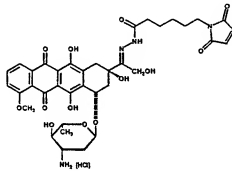
+ signifikant zur Gruppe, die Doxorubicin erhielt.

Beispiel 4

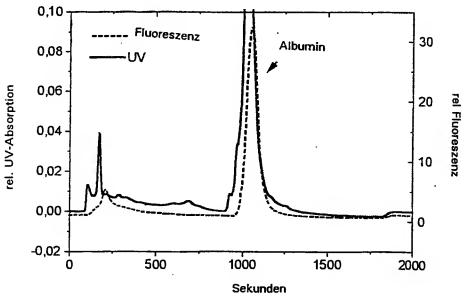
Bindung von DOXO-EMHC an Albumin im Humanplasma

1,6 mg des 6-Maleinimidocaprinsäurehydrazon-Derivats von Doxorubicin

(abgekürzt DOXO-EMHC) mit untenstehender Strukturformel



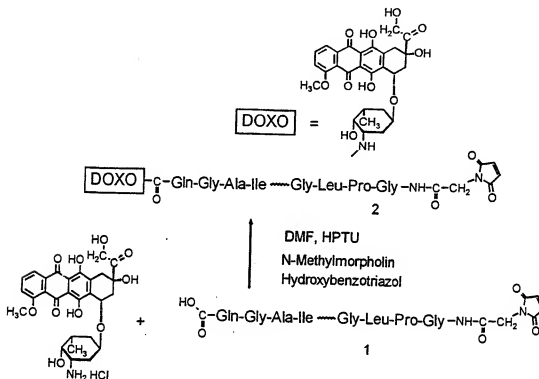
werden in 1,0 ml Phosphatpuffer (0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 6,5) bei Raumtemperatur gelöst (2000 μ M Lösung). Werden 250 μ l dieser Lösung mit 1,0 ml Humanplasma 30 Sekunden lang bei 37 °C inkubiert, und die Probe anschließend über einen schwachen Anionenaustauscher (von POROS®) getrennt, zeigt sich, daß der überwiegende Teil von DOXO-EMHC an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):



Beispiel 5

Bindung eines durch MMP9 spaltbares Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivats (2) an Albumin nach einminütiger Inkubation mit Humanplasma

Das Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat (2) wurde gemäß folgender Reaktionsgleichung hergestellt:

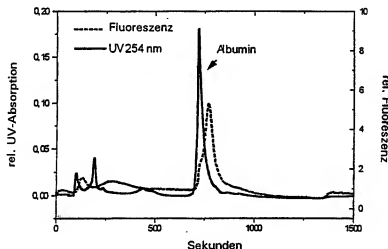


- 30 -

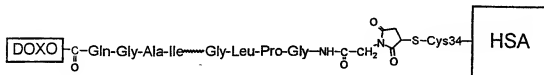
1 ml eingengt. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester/Methanol 2/1) wurden 5 mg 2 erhalten.

Inkubationsstudie mit Humanplasma

1,4 mg 2 (Mr 1374) werden in 1,0 ml Phosphatpuffer (0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 6,5) bei Raumtemperatur gelöst (1000 μ m Lösung). Werden 300 μ l dieser Lösung mit 1,0 ml Humanplasma 60 Sekunden lang bei 37 °C inkubiert, und die Probe anschließend über einen schwachen Anionenaustauscher (von POROS®) getrennt, zeigt sich, daß der überwiegende Teil von 2 an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):

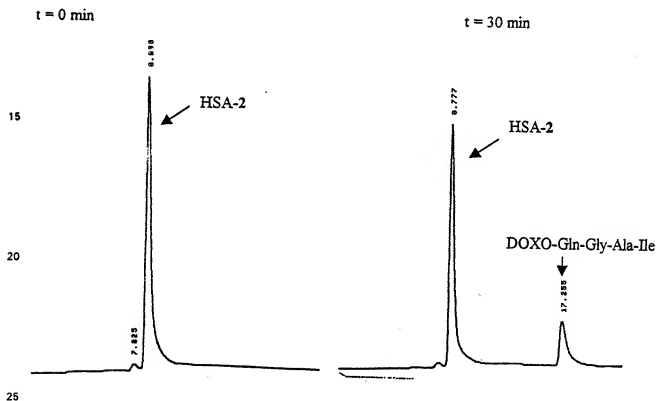


Die Peptidsequenz Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly wird von der Matrixmetalloprotease MMP9 erkannt und zwischen Isoleucin und Glycin gespalten. Dies wurde durch folgenden Versuch gezeigt: 200 μ l einer 100 μ M Lösung des Albuminkonjugats von 2 mit folgender Struktur (abgekürzt HSA-2):



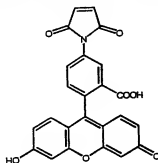
HSA = Human-Serum-Albumin

das durch das in der deutschen Patentanmeldung A19926475.9 vom 10. Juni 1999 beschriebene Verfahren hergestellt wurde, wurde mit Trypsin/Aprotinin aktivierter MMP9 (2 mU von Calbiochem, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die Freisetzung von DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile nach dieser Zeit ist in den untenstehenden Chromatogrammen abgebildet. Gezeigt ist das Chromatogramm von HSA-2 bei $t = 0$ (Trennung durch HPLC Ausschußchromatographie mit einer Biosil 250 SEC Säule von der Firma Biorad, Detektion bei $\lambda = 495$ nm) und nach einer Inkubationszeit mit aktivierter MMP9 von 30 Minuten.

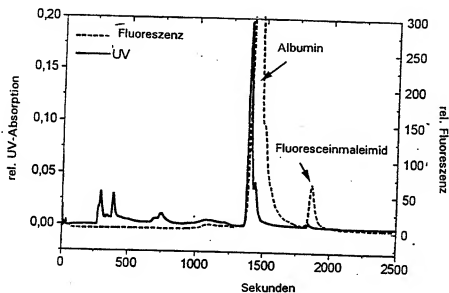


Beispiel 6

Bindung von Fluoresceinmaleinimid an Albumin im Humanplasma



Nach einer 5-minütigen Inkubation von 250 μ l einer 100 μ M Fluoresceinmaleinimid-Lösung (Phosphatpuffer - 0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 5,0) mit 1,0 ml Humanplasma und anschließenden Trennung der Probe mittels der Ausschlußchromatographie (Superdex® 200, Pharmacia), zeigt sich, daß der überwiegende Teil des Fluoresceinmaleinimids an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):



Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren
5 Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine therapeutisch und/oder
diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren
Trägerflüssigkeit gelöst wird, dadurch gekennzeichnet, daß als
therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz eine
10 Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff und wenigstens
einem proteinbindenden Molekülrest, die durch einen Spacer
verbunden sind, verwendet wird, worin der Spacer oder die
Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer pH-abhängig,
hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der
Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem
Spacer unter Freisetzung des Wirkstoffs oder eines Derivats des
Wirkstoffs im Körper spaltbar ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
daß der Wirkstoff ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein
Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein
Analgetikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein
Antimykotikum, ein Signaltransduktionsinhibitor, ein
25 Angiogeneseinhibitor oder ein Proteaseinhibitor ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet,
daß der Wirkstoff aus der Gruppe der Anthrazykline, der
Stickstofflostderivate, der Alkylantien, der Purin- oder
30 Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane,
der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-

Alkaloide, der Calicheamicine, der Maytansinoide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostisch wirksame Substanz ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das proteinbindende Molekül eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-Hydroxysuccinimidestergruppe, eine Isothiocyanat-Gruppe, eine Disulfidgruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe oder eine Acetylengruppe ist, die gegebenenfalls substituiert sein kann.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Spacer ein organischer Molekülrest ist, welcher eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 1-12 Kohlenstoffatomen, die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, und/oder mindestens einem Aromaten enthält, welche gegebenenfalls substituiert sein können.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer bzw. der proteinbindenden Molekülrest mindestens eine Peptidbindung enthält.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Trägermolekül verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Zusammenbringen des Trägermoleküls mit der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz ex vivo erfolgt.

11. Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest aufweist, welcher mit dem Wirkstoff durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Wirkstoff pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist, wobei der Wirkstoff kein Zytostatikum ist.

12. Diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Diagnostikum, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest, welcher mit dem Diagnostikum durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Diagnostikum pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist.

13. Verwendung der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Viruskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akute oder chronisch-entzündliche Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen verursacht sind.

14. Diagnostischer Kit, enthaltend die proteinbindende diagnostisch wirksame Substanz nach einem der Ansprüche 5 bis 12, gegebenenfalls ein Trägermolekül, sowie pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe, Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

15. Verwendung der diagnostisch wirksamen Substanz nach einem der Ansprüche 5 bis 10 und 12 oder des diagnostischen Kits nach Anspruch 14 zum Nachweis von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden und/oder zum Nachweis des Trägermoleküls und dessen Verteilung im Organismus.

16. Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, dadurch gekennzeichnet, dass als diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung umfassend ein Diagnostikum und wenigstens einen Protein-bindenden Molekülrest verwendet wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum und der Protein-bindende Molekülrest durch einen Spacer verbunden sind.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung zwischen dem Diagnostikum und dem Protein-bindenden Molekülrest oder der Spacer nicht spaltbar sind.

- 37 -

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum und der Protein-bindende Molekülrest durch eine Amidbindung miteinander verbunden sind.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/76551 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05272

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 154.7 9. Juni 1999 (09.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH [DE/DE];
Breisacher Strasse 17, D-79106 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRATZ, Felix
[DE/DE]; Klinik für Tumorbiologie, Breisacher Strasse
117, D-79106 Freiburg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 16. August 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AN INJECTABLE MEDICAMENT PREPARATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN ARZNEIMITTELZUBEREITUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing injectable medicament preparations containing a therapeutically and/or diagnostically effective substance which is comprised of an active agent, of a spacer molecule and of at least one protein-binding molecule. After being brought into contact with the body, said therapeutically and/or diagnostically effective substance covalently bonds to the body fluid constituents or tissue constituents via the protein-binding molecule, thus providing a form of transport of the active agent that can be hydrolytically or enzymatically cleaved, according to pH, in the body while releasing the active agent.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebestandteile bindet, so dass eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.
PCT/EP 00/05272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | DE 196 36 889 A (KRATZ FELIX DR) 12 March 1998 (1998-03-12) cited in the application page 3, line 18 - line 28; claims | 1-18 |
| Y | KRATZ F ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EFFICACY OF ALBUMIN CONJUGATES OF DOXORUBICIN" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN). JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, vol. 21, no. 1, 1998, pages 56-61, XP000738275 ISSN: 0918-6158 figure 1 | 1-18 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2001

Date of mailing of the international search report

23/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 00/05272

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| E | WO 00 76550 A (KRATZ FELIX ;KITB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21 December 2000 (2000-12-21) page 17, line 18 - line 26; claims | 1 |
| A | A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate; In vitro and in vivo studies." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 79, January 1982 (1982-01), pages 626-629, XP002162367 WASHINGTON US figure 1; table 1 | 1 |
| Y | S. NETZEL-ARNETT: "Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type iv Collagenases) and PUMP (Matrilysin)" BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 25, 1993, pages 6427-6432, XP002162368 EASTON, PA US cited in the application table 1 | 1-18 |
| X | M. NICHIFOR ET AL.: "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 39, 1996, pages 79-92, XP002162369 AMSTERDAM NL abstract; figure 1; table 1 | 1 |
| X | G. M. DUBOWCHIK ET AL.: "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin." BIOORG MED CHEM LETT., vol. 8, no. 23, December 1998 (1998-12), pages 3341-3346, XP002162370 page 3342; table 1 | 1-18 |
| X | M. KRÜGER ET AL.: "Synthesis and stability of four maleimide derivatives of the anticancer drug doxorubicin for the preparation of chemoimmunoconjugates" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, vol. 45, no. 2, 1997, pages 399-401, XP002162561 page 400, column 2, paragraph 1; figure 1 | 1-18 |

Continuation of Field I.2

Relevant Patent Claims Nos. 1-19 relate to an excessively large number of possible compounds/products/devices/methods. In fact, they comprise so many alternatives and possible permutations and/or limitations that they appear, in the given context, unclear (and/or too lengthy) under the terms of PCT Article 6 as if they enabled a meaningful search. For this reason, the search was directed at the sections of the patent claims which can be regarded as clear (and/or concise), namely the examples.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int: tional Application No

PCT/EP 00/05272

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 19636889 A | 12-03-1998 | AU 4548997 A | 02-04-1998 |
| | | WO 9810794 A | 19-03-1998 |
| | | EP 0934081 A | 11-08-1999 |
| | | JP 2001500133 T | 09-01-2001 |
| WO 0076550 A | 21-12-2000 | DE 19926475 A | 14-12-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05272

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y | DE 196 36 889 A (KRATZ FELIX DR) 12. März 1998 (1998-03-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 18 - Zeile 28; Ansprüche | 1-18 |
| Y | KRATZ F ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EFFICACY OF ALBUMIN CONJUGATES OF DOXORUBICIN" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, Bd. 21, Nr. 1, 1998, Seiten 56-61, XP000738275 ISSN: 0918-6158 Abbildung 1 | 1-18 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12. März 2001

23/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-2016

Bevollmächtigter Beauftragter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| E | WO 00 76550 A (KRATZ FELIX ;KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21. Dezember 2000 (2000-12-21) Seite 17, Zeile 18 - Zeile 26; Ansprüche | 1 |
| A | A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate; In vitro and in vivo studies." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 79, Januar 1982 (1982-01), Seiten 626-629, XP002162367 WASHINGTON US Abbildung 1; Tabelle 1 | 1 |
| Y | S. NETZEL-ARNETT: "Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and PUMP (Matrilysin)" BIOCHEMISTRY, Bd. 32, Nr. 25, 1993, Seiten 6427-6432, XP002162368 EASTON, PA US in der Anmeldung erwähnt Tabelle 1 | 1-18 |
| X | M. NICHIFOR ET AL.: "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 39, 1996, Seiten 79-92, XP002162369 AMSTERDAM NL Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 1 | 1 |
| X | G. M. DUBOWCHIK ET AL.: "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin." BIOORG MED CHEM LETT., Bd. 8, Nr. 23, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 3341-3346, XP002162370 Seite 3342; Tabelle 1 | 1-18 |
| X | M. KRÜGER ET AL.: "Synthesis and stability of four maleimide derivatives of the anticancer drug doxorubicin for the preparation of chemoimmunoconjugates" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, Bd. 45, Nr. 2, 1997, Seiten 399-401, XP002162561 Seite 400, Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 1 | 1-18 |

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-19 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte/Vorrichtung/Verfahren. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten und mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich die Beispiele.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05272

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19636889 A | 12-03-1998 | AU 4548997 A | 02-04-1998 |
| | | WO 9810794 A | 19-03-1998 |
| | | EP 0934081 A | 11-08-1999 |
| | | JP 2001500133 T | 09-01-2001 |
| WO 0076550 A | 21-12-2000 | DE 19926475 A | 14-12-2000 |

